

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA

Student-doctorand

ROȘCA ELENA-VALENTINA

2021

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

*Sinteza și caracterizarea unor compuși heterociclici din clasa
4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor
cu potențială acțiune biologică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA

Student-doctorand

ROȘCA ELENA-VALENTINA

Cuprins

Lista cu abrevieri.....	7
Mulțumiri.....	8
Introducere.....	9
I. Stadiul cunoașterii.....	12
Capitolul 1. 4-Ariliden-oxazol-5(4H)-one.....	12
1.1. Definiție. Clasificare.....	12
1.2. Metode de obținere a 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor.....	13
1.2.1. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din α -aminoacizi N-acilați și compuși carbonilici.....	13
1.2.2. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din alte oxazolone.....	27
1.2.2.1. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din oxazolone saturate.....	27
1.2.2.2. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din oxazolone nesaturate.....	28
1.2.3. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din α -cetoacizi și amide.....	29
1.2.4. Obținerea 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor din N-benzoilglicină și derivați ariliden/alchiliden ai dinitrilului acidului malonic.....	29
1.3. Metode spectrale pentru determinarea structurii 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor.....	30
1.3.1. Spectrometria în infraroșu.....	30
1.3.2. Spectrometria de rezonanță magnetică nucleară.....	30
1.3.3. Spectrometria de masă.....	31
1.3.4. Cristalografia de raze X.....	32
1.4. Proprietăți biologice ale 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor.....	33
Capitolul 2. 5-Ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-one.....	45
2.1. Definiție. Clasificare.....	45
2.2. Metode de obținere a 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor.....	45
2.2.1. Obținerea 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor din 4-ariliden-oxazol-5(4H)-one.....	45
2.2.1.1. Obținerea 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor prin reacția 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor cu hidrazina sau cu derivați ai acesteia.....	46
2.2.1.2. Obținerea 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor prin reacția 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor cu hidrazide.....	49

2.2.1.3. Obținerea 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor prin reacția 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onelor cu semicarbazida sau cu tiosemicarbazida.....	50
2.2.2. Obținerea 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor din derivați de hidrazidă prin ciclizare directă sau prin reacția cu acetilacetat de etil.....	51
2.3. Metode spectrale pentru determinarea structurii 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor.....	53
2.3.1. Spectrometria în infraroșu.....	53
2.3.2. Spectrometria de rezonanță magnetică nucleară.....	53
2.3.3. Spectrometria de masă.....	54
2.4. Proprietăți biologice ale 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor.....	55
II. Contribuții personale.....	61
Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	61
Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4<i>H</i>)-onelor.....	62
4.1. Introducere.....	62
4.2. Materiale și metode.....	62
4.3. Rezultate și discuții.....	64
4.3.1. Sinteza intermediarilor din clasa acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)-acetici 1a-c	64
4.3.2. Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 3-14	65
4.3.2.1. Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 3-14 prin metoda Erlenmeyer.....	65
4.3.2.2. Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 11a-c folosind aductul bisulfitic al 4-metoxibenzaldehidei.....	67
4.3.3. Determinarea structurii 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4 <i>H</i>)-onelor 3-14	69
4.3.3.1. Spectrele de absorbție în infraroșu.....	69
4.3.3.2. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară.....	75
4.3.3.3. Spectrele de masă.....	88
4.4. Partea experimentală.....	90
4.5. Concluzii.....	99

Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor	100
5.1. Introducere	100
5.2. Materiale și metode	100
5.3. Rezultate și discuții	101
5.3.1. Sinteza unor noi compuși din clasa 5-ariliden-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-2-fenil-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor 15-23	101
5.3.2. Determinarea structurii 5-ariliden-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-2-fenil-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor 15-23	103
5.3.2.1. Spectrele de absorbție în infraroșu	103
5.3.2.2. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară	108
5.3.2.3. Spectrele de masă	116
5.4. Partea experimentală	117
5.5. Concluzii	123
Capitolul 6. Testarea biologică a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor	124
6.1. Evaluarea acțiunii antimicrobiene a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor	124
6.1.1 Introducere	124
6.1.2. Testarea preliminară. Determinarea calitativă a acțiunii antimicrobiene a compușilor testați	125
6.1.2.1. Materiale și metode	125
6.1.2.2. Rezultate și discuții	126
6.1.3. Testarea cantitativă a acțiunii antimicrobiene în vederea determinării CMI a compușilor testați	126
6.1.3.1. Materiale și metode	126
6.1.3.2. Rezultate și discuții	127
6.1.4. Studiul influenței compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert prin determinarea CMEB	129
6.1.4.1. Materiale și metode	129
6.1.4.2. Rezultate și discuții	130
6.1.5. Studii de andocare moleculară	132
6.1.5.1. Materiale și metode	132

6.1.5.2. Rezultate și discuții.....	133
6.1.6. Concluzii.....	135
6.2. Evaluarea acțiunii antioxidante a noilor compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor.....	136
6.2.1. Introducere.....	136
6.2.2. Determinarea acțiunii antioxidante prin metoda DPPH.....	136
6.2.2.1. Materiale și metode.....	137
6.2.2.2. Rezultate și discuții.....	137
6.2.3. Determinarea acțiunii antioxidante prin metoda ABTS.....	139
6.2.3.1. Materiale și metode.....	139
6.2.3.2. Rezultate și discuții.....	139
6.2.4. Concluzii.....	141
6.3. Evaluarea acțiunii analgezice a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onelor.....	142
6.3.1. Introducere.....	142
6.3.2. Evaluarea toxicității acute <i>in vivo</i> a unor noi 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-one administrate în doză unică.....	142
6.3.2.1. Materiale și metodă.....	143
6.3.2.2. Rezultate și discuții.....	144
6.3.2.3. Concluzii.....	145
6.3.3. Examenul histopatologic în urma evaluării toxicității după administrarea în doză unică a unor noi 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-one.....	146
6.3.3.1. Materiale și metode.....	146
6.3.3.2. Rezultate și discuții.....	147
6.3.3.3. Concluzii.....	157
6.3.4. Evaluarea efectului analgezic al unor noi 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-one prin testul stimulului chimic și prin testul stimulului termic.....	158
6.3.4.1. Materiale și metode.....	158
6.3.4.2. Rezultate și discuții.....	160
6.3.4.3. Concluzii.....	163
6.3.5. Studii de andocare moleculară.....	163
6.3.5.1. Materiale și metode.....	163
6.3.5.2. Rezultate și discuții.....	165

6.3.6. Concluzii.....	167
6.4. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i> a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5 <i>H</i>)-onelor.....	167
6.4.1. Introducere.....	167
6.4.2. Evaluarea citotoxicității prin testele de citotoxicitate asupra <i>Daphnia magna</i> și <i>Artemia salina</i>	169
6.4.2.1. Materiale și metode.....	169
6.4.2.2. Rezultate și discuții.....	171
6.4.2.3. Concluzii.....	175
6.4.3. Evaluarea citotoxicității prin testul de creștere a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	176
6.4.3.1. Materiale și metode.....	176
6.4.3.2. Rezultate și discuții.....	177
6.4.3.3. Concluzii.....	179
6.4.4. Evaluarea citotoxicității asupra unor linii celulare umane și de șoarece.....	179
6.4.4.1. Materiale și metode.....	179
6.4.4.2. Rezultate și discuții.....	183
6.4.4.3. Concluzii.....	190
6.5. Investigarea potențialului unor noi 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one ca marcatori fluorescenți celulari.....	191
6.5.1. Introducere.....	191
6.5.2. Proprietăți optice ale noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 13a-c și 14a-c	191
6.5.3. Studiul încorporării noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 13a-c și 14a-c în celulele de <i>S. cerevisiae</i>	194
6.5.3.1. Materiale și metode.....	194
6.5.3.2. Rezultate și discuții.....	194
6.5.3.3. Concluzii.....	196
6.5.4. Evaluarea interacțiunii cu ADN-ul unui bacteriofag a noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 13a-c și 14a-c	196
6.5.4.1. Materiale și metode.....	196
6.5.4.2. Rezultate și discuții.....	197
6.5.4.3. Concluzii.....	198

6.5.5. Studiul încorporării și intensității fluorescenței noilor 4-(4-(dialchil-amino)benziliden)oxazol-5(4 <i>H</i>)-one 13a-c și 14a-c în celule normale și tumorale umane.....	198
6.5.5.1. Materiale și metode.....	198
6.5.5.2. Rezultate și discuții.....	200
6.5.5.3. Concluzii.....	208
Capitolul 7. Concluzii generale.....	210
Capitolul 8. Elemente de originalitate și perspective de cercetare.....	214
Bibliografie.....	216
Listă cu lucrările științifice publicate și participări la proiecte.....	240
Anexe.....	242

Introducere

Chimia heterociclorilor s-a dezvoltat foarte mult în ultimele decenii, numărul moleculelor care conțin nuclee heterociclice fiind practic inepuizabil.

Având în vedere că proprietățile biologice recunoscute ale heterociclorilor au determinat introducerea lor în structura a numeroase medicamente, cercetătorii de pe întreg mapamondul depun eforturi considerabile pentru a găsi noi agenți heterociclici care să acționeze asupra țintelor terapeutice pe măsură ce acestea sunt identificate [1].

Din datele de literatură se cunoaște că nucleul heterociclic oxazolic este prezent în structura unor compuși folosiți ca substanțe active în compoziția unor medicamente utilizate în terapia medicală pentru acțiunea lor antibacteriană (*sulfamoxol*) [2], antiinflamatoare (*oxaprozin*, *ditazol*) [3,4] sau antitumorală (*mubritinib*) [5].

Derivații de oxazol precum 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onele, reprezintă o clasă de compuși heterociclici importanți pentru proprietățile antibacteriene și antifungice [6-8], antiinflamatoare [9,10], analgezice [10], antitumorale [11], antidiabetice [12] și antioxidante [8,13].

Alături de proprietățile farmacologice, în literatură se menționează numeroși derivați de 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onă cu proprietăți optice deosebite, având un potențial semnificativ pentru a fi utilizați ca indicatori de pH și marcatori fluorescenți în bioimagnostică [14].

De menționat este că nucleul 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onic reprezintă o entitate chimică versatilă, fiind un intermediar des utilizat pentru obținerea altor compuși heterociclici cum sunt imidazoli sau triazinele, compuși cunoscuți de asemenea pentru activitatea lor biologică [9,13]. Ca urmare, 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onele sunt importante atât pentru sinteza organică, cât și pentru potențialul lor biologic [15].

Prin introducerea unui nou centru farmacofor într-o moleculă cu proprietăți biologice similare acesteia se pot obține noi compuși cu proprietăți biologice superioare. Astfel, ne-am propus în cadrul acestei lucrări să grefăm pe nucleul oxazolonic fragmentul arilsulfonilfenil. Alegerea acestui centru farmacofor este justificată, pe de o parte de proprietățile antimicrobiene [16], antivirale [17], antioxidante [18], antiinflamatoare [19] și antitumorale [20] ale diarilsulfonelor - *dapsona* fiind un medicament reprezentativ din această clasă [20,21], și pe de altă parte, de experiența și rezultatele obținute de colectivul

disciplinei Chimie Organică de la Facultatea de Farmacie UMF „Carol Davila”, București în domeniul unor compuși care conțin acest fragment arilsulfonilfenil [22,23].

O altă clasă importantă de compuși heterociclici, 1,2,4-triazinele, constituie obiectul unor cercetări actuale extinse, atât din punct de vedere al structurii și proprietăților lor fizico-chimice, cât și al potențialului lor biologic, acest nucleu fiind prezent în structura unor compuși cu acțiune antitumorală [24], anticonvulsivantă (*lamotrigina*) [25] sau antimicrobiană (*ceftriaxona*) [26]. Mai mult, din literatură se cunoaște că unii derivați de 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onă prezintă acțiune antimicrobiană [27], antiinflamatoare [9], antitumorală [28] și antioxidantă [13].

Similar cazului oxazolonei, considerăm că prezența fragmentului arilsulfonilfenil pe nucleul 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onic ar potența proprietățile lor biologice.

Având în vedere aceste date din literatură, ne-am propus, sinteza, caracterizarea și testarea biologică a unor noi compuși heterociclici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor care să conțină farmacoforul arilsulfonilfenil.

Sinteza celei de-a doua clase de compuși heterociclici, a 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor, s-a realizat utilizând drept materii prime 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onele, prima clasă de compuși heterociclici sintetizată de noi și prezentată în cadrul acestei lucrări.

Teza de doctorat cuprinde două părți:

- prima parte, Stadiul Cunoașterii
- a doua parte, Contribuții personale.

La aceste două părți principale ale lucrării se adaugă Introducerea, Lista cu abrevieri și simboluri, Bibliografia și Anexele, acestea din urmă conținând articolele publicate din teza de doctorat.

Prima parte a tezei de doctorat, cuprinde două capitole: Capitolul 1. 4-Ariliden-oxazol-5(4*H*)-one și Capitolul 2. 5-Ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one, în care sunt prezentate datele recente din literatura de specialitate cu referire la metodele de sinteză, caracterizarea spectrală și acțiunea biologică a acestor două clase de compuși.

În partea a doua, Contribuții personale, se prezintă designul, sinteza, caracterizarea fizico-chimică și testarea biologică a unor noi compuși heterociclici din cele două clase (Fig. 1):

- 4-ariliden-2-[4-(4-*X*-fenilsulfonil)-fenil]-oxazol-5(4*H*)-one (A)
- 5-(4-ariliden)-3-[4-(4-*X*-fenilsulfonil)-fenil]-2-fenil-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one (B).

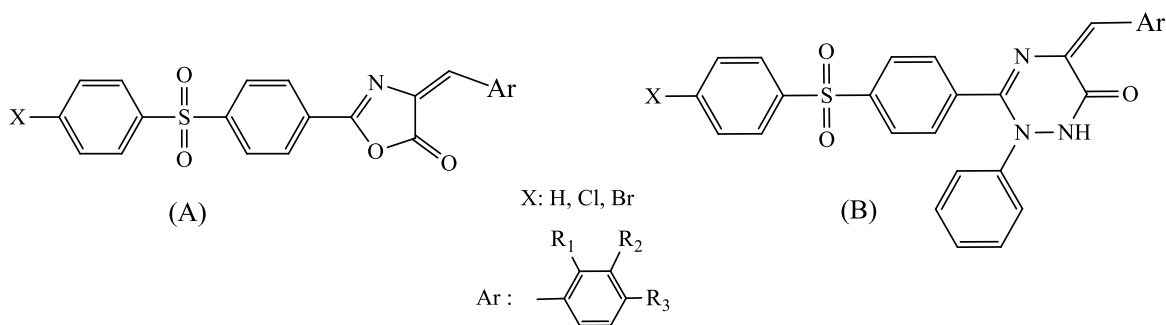


Figura 1. Formulele generale de structură a 4-ariliden-2-[4-(4-X-fenilsulfonil)-fenil]-oxazol-5(4*H*)-onelor (A) și 5-(4-ariliden)- 3-[4-(4-X-fenilsulfonil)-fenil]-2-fenil-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor (B)

Evaluarea acțiunii biologice a unora dintre noii compuși sintetizați s-a realizat prin determinarea:

- acțiunii antimicrobiene;
- acțiunii antioxidante;
- acțiunii analgezice;
- citotoxicității *in vitro* asupra microorganismelor *Daphnia magna*, *Artemia salina* și *Saccharomyces cerevisiae*, precum și asupra unor celule umane normale și tumorale umane și de melanom de șoarece;
- potențialului de a marca fluorescent celule normale și tumorale.

I. Stadiul Cunoașterii

Capitolul 1. 4-Ariliden-oxazol-5(4*H*)-one

Oxazolonele sunt compuși heterociclici pentaatomici, derivați de oxazol, care prezintă o grupă carbonil grefată pe nucleu. Dintre izomerii posibili cu această structură [29], oxazol-5(4*H*)-ona este unul dintre cei mai studiați datorită proprietăților chimice și biologice, dar și accesibilității metodelor de sinteză a acestei clase de compuși.

În acest capitol se prezintă detaliat metodele de obținere a 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor, insistând în mod deosebit asupra celei mai utilizate, metoda Erlenmeyer. Aceasta constă în condensarea α -aminoacizilor N-acilați cu compuși carbonilici [30], fiind descrisă și folosită și de noi în cadrul acestei lucrări.

Acest capitol cuprinde de asemenea, descrierea detaliată a proprietăților biologice a numeroși derivați de 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onă.

Capitolul 2. 5-Ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one

Dintre izomerii triazinelor, 1,2,4-triazina este unul dintre cei mai studiați, în special izomerul care conține în poziția 6 o grupă ceto, acesta fiind modelul structural propus și sintetizat în cadrul acestei lucrări [31].

Și în acest capitol sunt prezentate metodele de obținere, de determinare a structurii și proprietățile biologice ale compușilor heterociclici din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor.

Dintre metodele de obținere a acestei clase de compuși, este de menționat că cea mai eficientă metodă este aceea care folosește ca materie primă 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onele, de tipul celor proiectate și sintetizate în cadrul acestei lucrări. Metoda se bazează pe reacția 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor cu hidrazina sau cu compuși care conțin fragmentul hidrazinic [9,27,28].

Dintre 1,2,4-triazin-6-one, derivații substituiți în poziția 5 cu fragmentul ariliden prezintă diferite proprietăți biologice, printre care antimicrobiene, antitumorale, antiinflamatoare, antioxidante, descrise de asemenea în acest capitol.

II. Contribuții personale

Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Datele de literatură referitoare la 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-one sunt semnificative atât pentru varietatea metodelor de sinteză folosite, cât mai ales pentru multiplele proprietăți biologice. Astfel, așa cum s-a arătat în partea introductivă, există numeroase referiri la proprietățile antimicrobiene, antioxidante, analgezice, antiinflamatoare, antitumorale ale acestei clase de heterocicluri [15], dar și la proprietățile fluorescente cu potențiale aplicații biomedicale (ex. marcatori fluorescenți, indicatori de pH) [32]. De asemenea, s-a arătat că există diferite medicamente a căror substanță activă conține un nucleu de oxazol, printre care: *sulfamoxolul*, *oxaprozinul*, *ditazolul*, *mubritinibul*, *deflazacortul* și *telitromicina* [2-5,33,34].

O altă clasă de compuși selectată din literatură ca având proprietăți biologice marcante e reprezentată de 1,2,4-triazin-6(5*H*)-one. Unii dintre acești compuși prezintă proprietăți antibacteriene, antifungice, antiinflamatoare, antioxidante sau antitumorale [9,13,27,28].

Pe baza acestor date de literatură, s-a considerat că ar fi important să se sintetizeze noi compuși heterociclici din aceste clase în scopul identificării de noi agenți biologici. În etapa de design a acestor compuși s-a avut în vedere grefarea pe moleculă a fragmentului arilsulfonilfenil, deoarece acesta reprezintă un farmacofor important, cunoscut fiind faptul că diferiți derivați din clasa diarilsulfonelor prezintă un spectru larg de proprietăți biologice, printre care antibacteriană [16], antivirală [17], antitumorală [20], antioxidante [18] și antifungică [35].

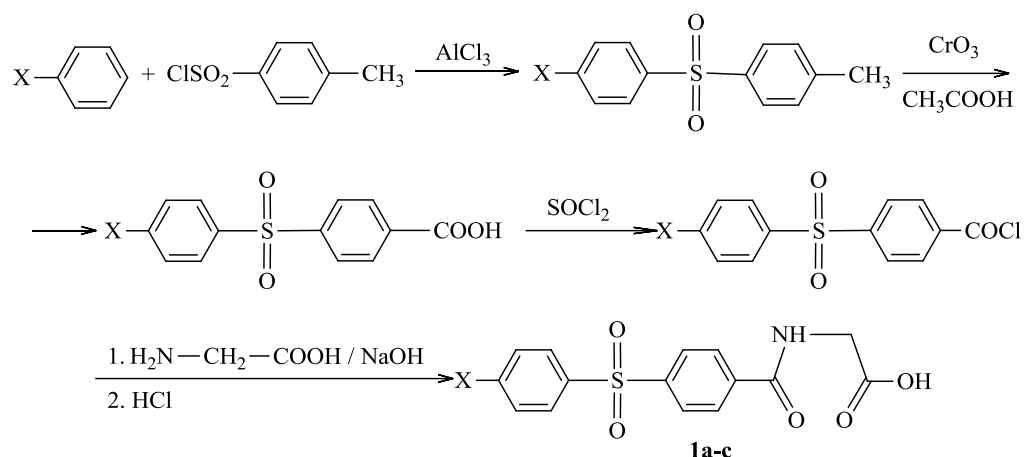
Având în vedere toate aceste date, ne-am propus următoarele obiective:

- sinteza unor noi 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-one;
- sinteza unor noi 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one;
- caracterizarea fizico-chimică și spectrală a noilor 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-one și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one prin analiză elementală și prin spectrometrie în IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN și SM;
- evaluarea acțiunii antimicrobiene a unora dintre noii compuși obținuți;
- evaluarea acțiunii antioxidante a compușilor obținuți;
- evaluarea acțiunii analgezice a unora dintre noii compuși obținuți;
- evaluarea citotoxicității a unora dintre noii compuși obținuți;
- evaluarea potențialului unora dintre compuși de a marca fluorescent celule umane (normale și tumorale) și non-umane.

Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor

Sinteza intermediarilor din clasa acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)-acetici 1a-c

Sinteza 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor s-a realizat folosind ca intermediari cheie acizii 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** care au fost obținuți conform procedeele menționate în literatură [36,37], printr-o sinteză în patru etape (Schema 1).



1a. X: H, **1b.** X: Cl, **1c.** X: Br

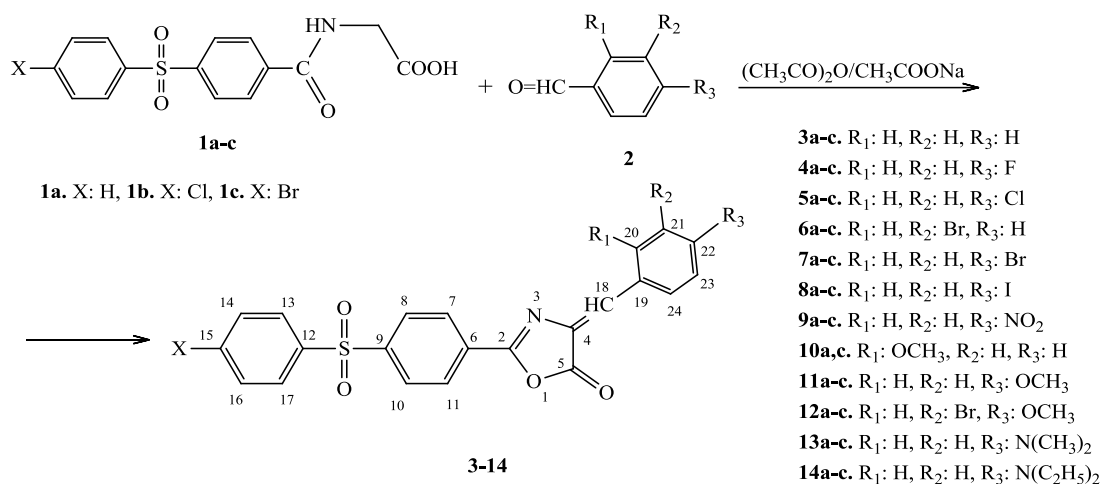
Schema 1. Sinteza acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici intermediari **1a-c**

Astfel, în prima etapă, prin reacția de alchilare Friedel-Crafts dintre clorura de tosil și benzen sau halogenobenzen (X: Cl, Br) s-au obținut diarilsulfonele corespunzătoare. În următoarea etapă, prin oxidarea diarilsulfonelor, în prezență de anhidridă cromică și acid acetic glacial, s-au sintetizat acizii 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoici care, prin reacția cu clorura de tionil, au condus la clorurile corespunzătoare acestor acizi carboxilici. În ultima etapă, intermediarii cheie, acizii 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c**, s-au obținut prin acilarea glicinei cu clorurile acizilor 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoici, în mediu bazic, urmată de acidularea amestecului de reacție cu acid clorhidric.

Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-one 3-14

Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-one 3-14 prin metoda Erlenmeyer

Obținerea noilor compuși heterociclici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor **3-14** s-a realizat prin metoda Erlenmeyer [30], care a constat în refluxarea unui amestec echimolecular format din acizii 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** cu diferite aldehide aromatice **2**, în mediu de anhidridă acetică și în prezență de acetat de sodiu anhidru. Astfel, prin condensarea și ciclizarea simultană a acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** cu aldehide aromatice s-au obținut noii compuși heterociclici pentaatomici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor, cu randamente cuprinse în intervalul 16-80% (Schema 2) [38,39].

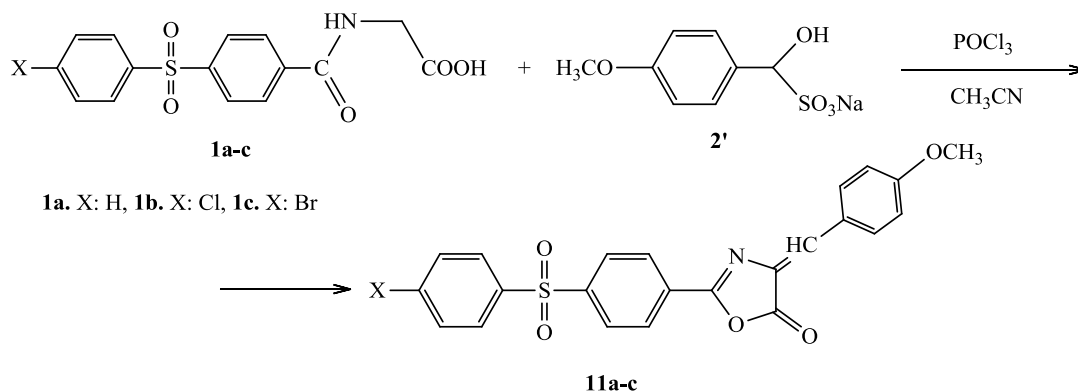


Schema 2. Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)-fenil)oxazol-5(4H)-one **3-14** prin metoda Erlenmeyer

Pentru sinteza oxazoloneilor, în scopul stabilirii relației între structura și activitatea biologică a unora dintre acestea, s-au folosit aldehide aromatice substituie cu diferiți substituenți (halogen, metoxi, N,N-dialchilamino, nitro).

Sinteza unor noi 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-one 11a-c folosind aductul bisulfitic al 4-metoxibenzaldehidei

Pentru a obține rezultate comparabile cu metoda clasică, oxazolonele **11a-c** s-au obținut și prin reacția acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** cu aductul bisulfitic al 4-metoxibenzaldehidei (hidroxi-(4-metoxifenil)metansulfonatul de sodiu), în prezență de POCl₃ și CH₃CN (Schema 3), acesta din urmă fiind obținut prin tratarea aldehidei cu sulfat acid de sodiu generat din reacția de hidroliză a metabisulfidului de sodiu [40].



Schema 3. Obținerea oxazol-5(4H)-onelor **11a-c** prin reacția acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** cu aductul bisulfitic al 4-metoxibenzaldehidei

Deși timpul de reacție a fost mai redus (o oră de reflux față de 4 ore în cazul reacției Erlenmeyer), randamentele obținute în acest caz au fost mai mici (14-35%) comparativ cu metoda Erlenmeyer (38-62%), fapt ce ne-a determinat să continuăm sintezele pentru ceilalți compuși folosind metoda Erlenmeyer.

În cazul utilizării aducților aldehidei benzoice și 4-fluorobenzoice, reacția de obținere a oxazonelor a eșuat.

Determinarea structurii 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onelor 3-14

Structura chimică a 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor **3-14**, dedusă din ecuațiile reacțiilor chimice, a fost confirmată prin analize spectrale (IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, SM) și prin analiză elementală.

Spectrele de absorbție în infraroșu

În spectrele în infraroșu ale 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onelor **3-14**, principala dovadă că reacția de ciclocondensare a acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c** cu diferite aldehide aromatice a avut loc, o reprezintă dispariția benzii de absorbție caracteristică vibrației de întindere a grupei amino (νNH), prezentă în spectrele aminoacizilor N-acilați în regiunea $3341\text{-}3416\text{ cm}^{-1}$ [36,37].

O altă dovadă foarte importantă este prezența benzilor de absorbție de intensitate mare, în regiunea $1758\text{-}1805\text{ cm}^{-1}$, datorate grupei carbonil lactonice.

Prezența în spectrele IR ale acestor compuși a unei noi benzi de absorbție în regiunea $1637\text{-}1658\text{ cm}^{-1}$, în general de intensitate mare, se datorează vibrațiilor de întindere $\nu\text{C}=\text{N}$, peste acestea suprapunându-se probabil, benzile datorate vibrațiilor $\nu\text{C}=\text{CH}$ exociclice, în acord cu literatura [7].

Grupa sulfonă din compușii oxazol-5(4H)-onici este prezentă în spectrele IR prin benzile de absorbție situate în regiunea $1156\text{-}1165\text{ cm}^{-1}$ datorate vibrațiilor de întindere simetrice $\nu_{\text{sim}}\text{SO}_2$ și în zona $1272\text{-}1399\text{ cm}^{-1}$ atribuite vibrațiilor de întindere antisimetrice $\nu_{\text{as}}\text{SO}_2$.

Celelalte unități structurale din 4-ariliden-oxazolonele **3-14** sunt puse în evidență în spectrele IR prin benzi de absorbție prezente la valori corespunzătoare ale numerelor de undă.

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară

Spectrele ^1H -RMN ale 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor **3-14** prezintă un semnal singlet caracteristic protonului grupei $=\text{CH}-$ din fragmentul benziliden, legat de atomul de carbon

din poziția 4 a nucleului oxazolonic, la $\delta=7,20-7,65$ ppm, care confirmă că reacția de condensare a aminoacizilor N-acilați intermediari **1a-c** cu aldehidele aromatice **2** a avut loc. De asemenea, absența semnalului triplet al protonului grupei NH de la $\delta=8,22-9,09$ ppm și a semnalului dublet al protonilor grupei $-\text{CH}_2-$ de la $\delta=3,94-4,37$ ppm din aminoacizii N-acilați intermediari **1a-c** [36,37] reprezintă o altă dovadă că reacția de condensare a avut loc simultan cu reacția de ciclizare.

În cazul oxazol-5(4*H*)-onelor **10a,c**, **11a-c** și **12a-c** care conțin grupa metoxi în pozițiile *orto* sau *para* pe nucleul benzilidenic, semnalul singlet al celor trei protoni din această grupă apare la $\delta=3,84-3,96$ ppm. Pentru derivații oxazolonici care conțin fragmentul 4-N,N-dimetilamino **13a-c** semnalul singlet al protonilor celor două grupe metil este prezent la 3,13-3,14 ppm. În cazul derivaților care conțin fragmentul 4-N,N-dietilamino **14a-c**, semnalul triplet al protonilor celor două grupe metil apare la $\delta\sim 1,24$ ppm cu o constantă de cuplaj $J=6,8$ Hz, iar semnalul protonilor celor două grupe metilen apare, sub formă de quartet, la $\delta\sim 3,47$ ppm, având aceeași constantă de cuplaj.

Spectrele ^{13}C -RMN ale oxazol-5(4*H*)-onelor **3-14** pun în evidență nucleul heterociclic oxazolonic prin prezența a trei semnale caracteristice atomilor de carbon din pozițiile 2, 4 și 5. Astfel, semnalul atomului de carbon din poziția 2 este prezent la o deplasare chimică în intervalul $\delta=157,96-164,35$ ppm, semnalul atomului de carbon din poziția 4 ($>\text{C}=\text{CH}$) apare la $\delta=130,19-152,18$ ppm, iar cel al atomului de carbon carbonilic ($\text{C}=\text{O}$) rezonază la $\delta=165,85-169,35$ ppm, acest din urmă atom de carbon fiind și cel mai dezecranat din moleculă.

De asemenea, prezența semnalului atomului de carbon benzilidenic din poziția 18 ($>\text{C}=\text{CH}$), la valori ale deplasării chimice de 130,18-135,62 ppm, confirmă reacția de condensare a aminoacizilor N-acilați **1a-c** cu aldehidele.

Și în spectrele ^{13}C -RMN ale compușilor **10a,c**, **11a-c** și **12a-c** grupa metoxi prezentă în moleculă pe nucleul benzilidenic în pozițiile *orto*- sau *para*- este pusă în evidență prin semnalul atomului de carbon al acestei grupe la valori ale deplasării chimice de 55,53-56,02 ppm. În cazul oxazolonelor care conțin fragmentul 4-N,N-dimetilamino **13a-c**, atomii de carbon din grupa metil rezonază la 40,64-47,45 ppm, fiind mai ecranați decât atomul de carbon din grupa metoxi datorită electronegativității mai mici a atomului de azot față de oxigen. Semnalele atomilor de carbon din fragmentul 4-N,N-dietilamino din oxazolonele **14a-c** apar în spectrele ^{13}C -RMN la valori ale δ cuprinse în intervalul 12,57-12,64 ppm în grupa metil, respectiv la 44,75-44,81 ppm în grupa metilen.

Protonii și atomii de carbon din fragmentul arilsulfonilfenil și din nucleul aromatic din fragmentul ariliden prezintă valori ale deplasărilor chimice corespunzătoare, în funcție de substituția grefați pe aceștia.

Spectrele de masă

Spectrele de masă înregistrate, prin ionizare pozitivă, pentru noii compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor au confirmat structura acestora prin prezența ionilor moleculari corespunzători maselor moleculare și a fragmentelor obținute în urma scindării acestora. Ionii moleculari protonați respectă raportul izotopic natural pentru oxazolonele care conțin halogeni (Cl sau Br).

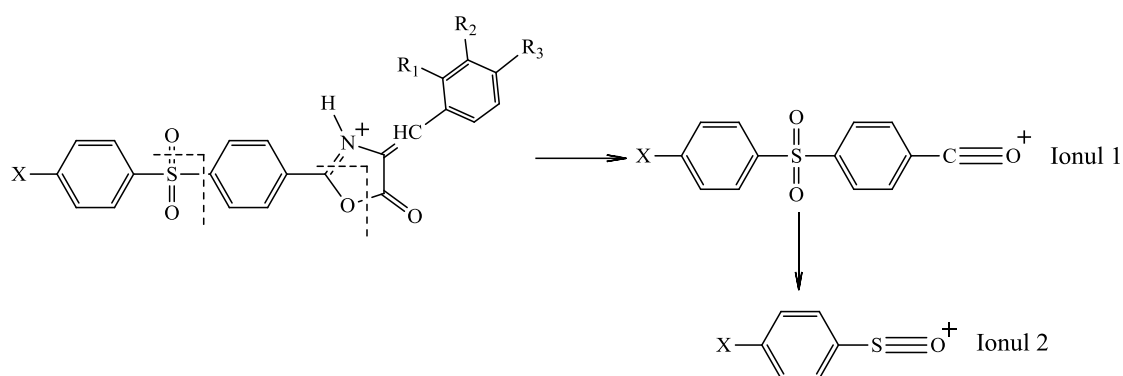


Figura 2. Modul de fragmentare propus pentru 4-ariliden-2-(4-(X-fenilsulfonil)-fenil)oxazol-5(4*H*)-one

În ceea ce privește modul probabil de fragmentare, oxazolonele suferă o scindare a moleculei la nivelul nucleului oxazolonic cu formarea ionului 1 $[X C_6H_4SO_2C_6H_4CO]^+$, care ulterior se fragmentează formându-se ionul 2 $[X C_6H_4SO]^+$ (Fig. 2).

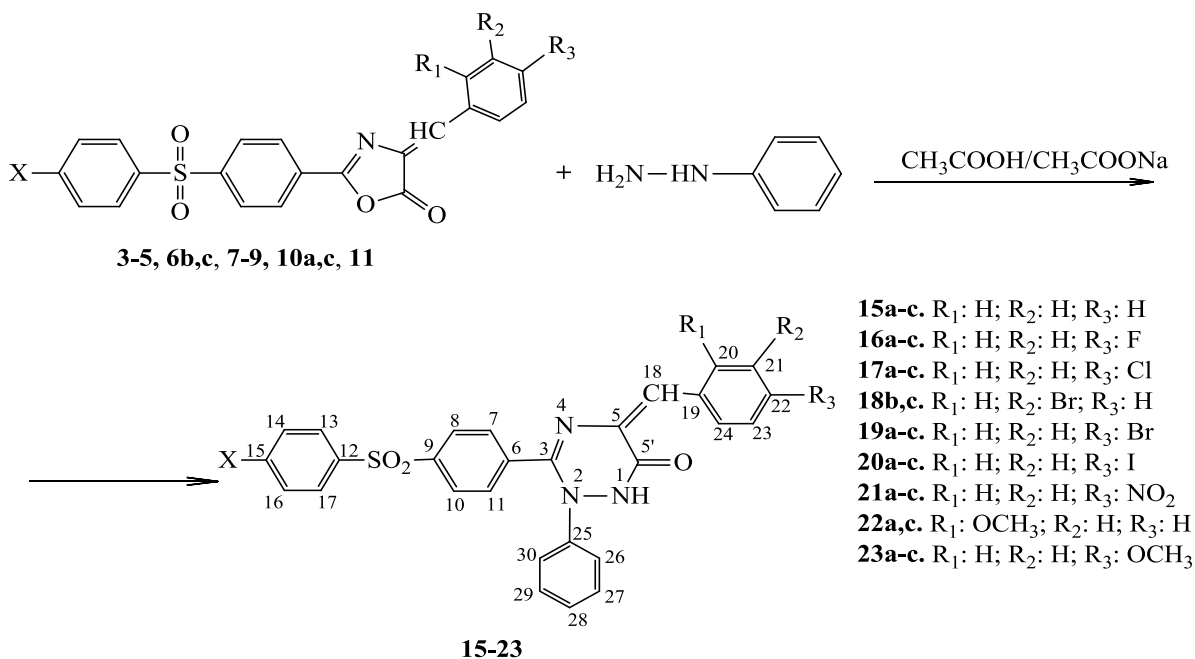
Fragmentarea propusă în prima etapă este dovedită prin existența unui ion $[C_6H_5SO_2C_6H_4CO]^+$ cu un raport $m/z=245$, caracteristic oxazolonele la care fragmentul arilsulfonilfenil nu este substituit. În cazul în care fragmentul arilsulfonilfenil este substituit cu un atom de clor, apar două fragmente cu $m/z=279$ și $m/z=281$, în funcție de masa izotopului de Cl. Dacă pe fragmentul arilsulfonilfenil este prezent atomul de brom, în spectrul de masă apar două fragmente cu $m/z=323$ și $m/z=325$, în funcție de masa izotopului de Br.

Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor

Sinteza unor noi compuși din clasa 5-ariliden-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-2-fenil-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor 15-23

Compușii heterociclici din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor au fost obținuți din 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onele prezentate în capitolul 4.

Astfel, prin reacția de condensare a unor 4-ariliden-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-oxazol-5(4*H*)-one 3-5, 6b,c, 7-9, 10a,c, 11 obținute anterior, cu fenilhidrazina, în cataliză heterogenă, utilizând drept catalizator acetatul de sodiu anhidru, în mediu de acid acetic glacial, s-au obținut noii compuși heterociclici hexaatomici din clasa 5-ariliden-2-fenil-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor 15-23. Reacția a avut loc la reflux, timp de 5 ore, randamentele de obținere fiind cuprinse în intervalul 17-95% (Schema 4).



Schema 4. Sinteza unor noi compuși din clasa 5-ariliden-2-fenil-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)-fenil)-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor 15-23

Determinarea structurii 5-ariliden-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-2-fenil-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor 15-23

Spectrele de absorbție în infraroșu

Cea mai importantă dovadă că reacția de condensare a 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor cu fenilhidrazina a avut loc, o reprezintă existența în spectrul IR al noilor compuși **15-23** a unei noi benzi de absorbție, în intervalul $3231-3333\text{ cm}^{-1}$, care se datorează vibrației de întindere a grupei amino (νNH), în acord cu alte date de literatură pentru compuși diferiți, dar din aceeași clasă [9]. De asemenea, o altă dovadă foarte importantă o reprezintă prezența unei benzi de absorbție caracteristică vibrației de întindere a grupei carbonil $\nu\text{C=O}$ din poziția 6 a nucleului triazinonic care apare în regiunea $1705-1741\text{ cm}^{-1}$, la valori mai mici decât cele corespunzătoare vibrațiilor grupei carbonil lactonice din oxazol-5(4H)-one.

Benzile de absorbție din regiunea $1627-1643\text{ cm}^{-1}$, în general de intensitate mare, se datorează vibrațiilor de întindere $\nu\text{C=N}$, peste acestea suprapunându-se probabil benzile datorate vibrațiilor $\nu\text{C=CH}$ ale legăturii duble exociclice.

Ca și în cazul oxazolinelor, celelalte benzi de absorbție caracteristice celorlalte unități structurale din molecula acestor compuși sunt prezente în spectrele IR la valorile corespunzătoare ale numerelor de undă.

Spectrele ^1H -RMN

În spectrele ^1H -RMN ale acestor compuși se remarcă un nou semnal singlet, cel mai dezecranat din spectru, la $\delta=8,98-9,03\text{ ppm}$, care se datorează protonului grupei NH, confirmându-se astfel reacția de condensare a 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor cu fenilhidrazina. Semnalul singlet corespunzător grupei $=\text{CH-}$ (H-18) din fragmentul benziliden din poziția 5 apare în spectrele de proton ale acestor compuși la $\delta=7,29-7,62\text{ ppm}$. Se remarcă faptul că nu are loc o deplasare semnificativă a acestui semnal singlet față de cel din structura oxazolinelor precursori în cazul cărora semnalul singlet atribuit protonului H-18 se găsește la $\delta=7,20-7,65\text{ ppm}$.

Referitor la nucleul fenil monosubstituit care provine din fenilhidrazină, protonii H-26,30 rezonează la $\delta=6,68-6,78\text{ ppm}$ și au constanta de cuplaj $J=7,4-8,0\text{ Hz}$, fiind prezenți în spectru sub forma unui semnal dublet, iar cei din pozițiile H-27,29, sub formă de triplet, rezonează la $7,00-7,80\text{ ppm}$ ($J=7,1-8,2\text{ Hz}$). Protonul din poziția 28 din același fragment apare ca un semnal triplet, la $6,73-6,84\text{ ppm}$, cu $J=6,2-7,9\text{ Hz}$.

Spectrele ^{13}C -RMN

În spectrele ^{13}C -RMN ale noilor compuși **15-23**, nucleul 1,2,4-triazin-6(5*H*)-onic este pus în evidență prin semnalele atomilor de carbon C-3, C-5 și C=O. Astfel, atomul de carbon din poziția 3 rezonează la o deplasare chimică în intervalul $\delta=159,14-161,88$ ppm, atomul de carbon C-5 la $\delta=133,68-139,30$ ppm, iar atomul de carbon carbonilic la $\delta=166,70-168,91$ ppm, acesta din urmă fiind și cel mai dezecranat atom din moleculă.

De asemenea, spectrele ^{13}C -RMN ale 5-amiliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor au evidențiat semnalul atomului de carbon =CH- benzilidenic, care rezonează la $\delta=126,31-130,95$ ppm.

Atomii de carbon din nucleul fenil monosubstituit care provine de la fenilhidrazină apar în spectrele ^{13}C -RMN la următoarele valori ale deplasărilor chimice: $\delta=120,33-120,57$ ppm pentru atomul de carbon C-25, $\delta=129,30-129,89$ ppm pentru C-27, C-29, $\delta=112,35-112,56$ ppm pentru C-26, C-30 și $\delta=145,98-146,71$ ppm în cazul C-28.

Ca și în cazul oxazonelor, ceilalți protoni sau atomi de carbon din fragmentul arilsulfonilfenil sau din nucleul aromatic al fragmentului benzilidenic, alături de celelalte grupe prezente în moleculă, rezonează la valori ale deplasărilor chimice corespunzătoare.

Spectrele de masă

Prezența ionilor moleculari deprotonați din spectrele de masă ale 5-amiliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor **15-23**, realizate prin ionizare negativă, a confirmat masa moleculară a acestora compuși, respectând de asemenea raportul izotopic natural pentru derivații care conțin atomii de clor sau brom în moleculă.

Triazinonele suferă o scindare a moleculei la nivelul nucleului triazinonic cu pierderea fragmentului $[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}]$, așa cum se observă din figura 3.

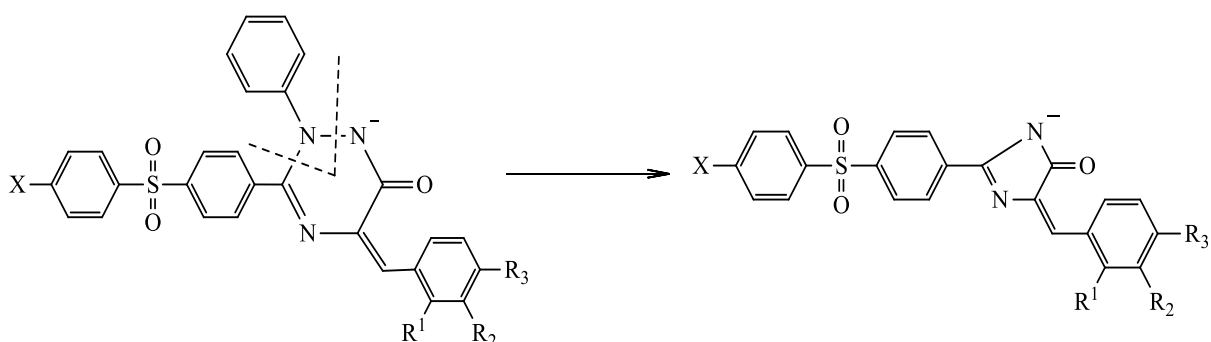


Figura 3. Modul de fragmentare propus pentru 5-amiliden-3-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)-2-fenil-1,2-dihidro-1,2,4-triazin-6(5*H*)-one

Capitolul 6. Testarea biologică a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor

Evaluarea acțiunii antimicrobiene a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor

A fost studiată acțiunea antibacteriană și antifungică a unor compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor asupra unor tulpini microbiene de referință, 2 gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 2 gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și una fungică, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

În urma studiului preliminar, la testarea calitativă prin metoda difuzimetrică adaptată, a compușilor din clasa oxazol-5(4H)-onelor **3-13** și triazin-6(5H)-onelor **15-23**, s-a constatat că din cauza solubilității scăzute în mediul de cultură, niciunul din compușii studiați nu a generat o zonă de inhibiție.

A fost determinată ulterior concentrația minimă inhibitorie (CMI) prin metoda diluțiilor binare seriale și concentrația minimă de eradicare a biofilmului bacterian (CMEB) pentru 23 compuși din aceste clase.

Compușii testați pe tulpinile microbiene luate în studiu au avut o activitate antimicrobiană în general slabă, cu valori ale CMI=0,625-2,5 mg/mL, mult mai mari decât valorile CMI ale antibioticelor folosite ca referință (ticarcilină și fluconazol).

Screening-ul activității anti-biofilm a indicat în schimb un efect anti-biofilm bun, cu valori ale CMEB=0,625-2,5 mg/mL, dar în general similare și în unele cazuri chiar mici decât valorile CMEB ale antibioticelor de referință.

Rezultatele obținute au arătat că oxazolonele prezintă, atât activitate antimicrobiană cât și anti-biofilm, în general mai bună decât triazinonele, un număr mai mare de compuși din prima clasă inhibând creșterea a diferite tulpini microbiene la valori CMI/CMEB de 0,625 mg/mL.

Activitate antimicrobiană mai bună, cu valori CMI=0,625 mg/mL, au prezentat oxazolonele **12a-c** care conțin în moleculă atomul de brom în poziția 3 și grupa metoxi în poziția 4 pe fragmentul benziliden, asupra tulpinilor de *E. faecalis* și de *C. parapsilosis*, sau asupra celei de *P. aeruginosa* (compușii **12a** și **12b**) sau de *E. coli* (**12c**). De asemenea, aceleași valori ale CMI a prezentat derivatul oxazolonice **9a** care conține în moleculă grupa nitro în poziția 4 a fragmentului benzilidenic, fiind activ pe tulpinile de *E. faecalis*, *E. coli* și *C. parapsilosis*. Trei derivați de oxazolonă au inhibat creșterea doar a două tulpini,

derivații **6a** și **6b**, a celei de *E. faecalis* și de *C. parapsilosis*, iar derivatul **9b** a împiedicat dezvoltarea culturilor de *E. faecalis* și *C. parapsilosis*.

În cazul biofilmelor, tot oxazolonele **12a-c** au fost cele mai active inhibând creșterea dezvoltării a trei tulpini: *E. faecalis* și *C. parapsilosis*, *E. coli* (**12a** și **12b**) sau *P. aeruginosa* (**12c**), valorile CMEB (0,625 mg/mL) fiind asemănătoare sau în unele cazuri chiar mai mici față de cele ale standardelor. Derivații **6a** și **6b** au avut aceeași valoare pentru CMEB, dar doar pentru două tulpini microbiene: *P. aeruginosa* și *C. parapsilosis*, iar derivatul **9b** a fost activ asupra *E. faecalis* și *P. aeruginosa*.

Cu excepția derivatului **9b**, oxazolonele **6a-b** și **12a-c** cu acțiune bună (active pe două sau trei tulpini) prezintă constant în poziția 3 atomul de brom pe fragmentul benziliden. Prezența în structură a fragmentului 3-bromobenzilidenic și a unei grupe metoxi în poziția 4 a condus la lărgirea spectrului antimicrobian (compuși **12a-c**).

Au fost realizate studii de andocare moleculară pentru oxazolonele **6a-c** și **12a-c** utilizând soft-ul de screening virtual PyRx 0.8, fiind aleasă ca țintă terapeutică subunitatea ribozomală 50S a *S. aureus*, pe baza similitudinii structurale a oxazolonelelor cu antibioticul linezolid. Conform acestor studii, legarea de subunitatea ribozomală 50S a *S. aureus* reprezintă un mecanism probabil de acțiune pentru oxazolonele studiate.

Evaluarea acțiunii antioxidante a noilor compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor

Toți compușii sintetizați în cadrul acestei lucrări au fost testați cu scopul stabilirii potențialului antioxidant. S-au folosit două metode: metoda DPPH și metoda ABTS. Deși rezultatele obținute au indicat un potențial antioxidant slab, s-a observat că în ambele metode un număr mai mare de triazinone a prezentat un oarecare potențial antioxidant. Metoda ABTS a indicat o acțiune antioxidantă mai bună pentru un număr de șase compuși testați la concentrația de 500 μM, patru din clasa triazinonelor (**17b**, **17c**, **19c**, **22a**) și numai doi din clasa oxazolonelelor (**4b**, **5a**), valorile procentelor de inhibiție fiind cuprinse în intervalul 30,53-39,58%. Dintre aceștia, compusul oxazolonic **5a** a avut cea mai bună acțiune antioxidantă (39,58±0,93 %).

Evaluarea acțiunii analgezice a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor

Ponind de la datele literatură conform cărora unii compuși cu nucleu oxazolic prezintă acțiune analgezică și antiinflamatoare [9,10], care a determinat folosirea lor în terapeutică

[3,4], s-a testat acțiunea analgezică a unor compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor **3c**, **11c**, **9c** și **7c**, acest studiu fiind precedat de evaluarea toxicității acute *in vivo* și de examenul histopatologic al unor organe prelevate de la șoareci.

Rezultatele experimentale obținute la evaluarea toxicității acute *in vivo* au evidențiat faptul că administrarea per os a compușilor testați în doze de 300 mg/kg corp, respectiv 2000 mg/kg corp nu a produs letalitate. Pentru toate loturile testate, modificările greutății corporale au fost reduse, neînregistrându-se schimbări ale aspectului exterior sau ale comportamentului motor al animalelor.

Conform ghidului OECD 423 pentru determinarea toxicității orale a substanțelor chimice după doză unică, compușii testați s-au încadrat în categoria 5 (DL50 2000-5000 mg/kg, p.o), în conformitate cu datele incluse în Sistemul Global de Armonizare [41].

După cele 14 zile de observație, animalele care au primit o doză de 2000 mg/kg corp și cele din lotul martor M 2000 au fost eutanasiate și li s-au recoltat: creierul, cordul, ficatul, rinichii și splina pentru a fi efectuat un examen histopatologic.

În toate cazurile examinate, examenele histopatologice nu au indicat aspecte citohistopatologice ce pot fi atribuite unui proces infecțios, neoplazic sau citotoxic. Sub aspect lezional și topostructural nu au fost constatate diferențe semnificative între cazurile de la loturile de șoareci cărora li s-au administrat oxazolonele testate și lotul martor (ex. Fig. 4 și Fig. 5).

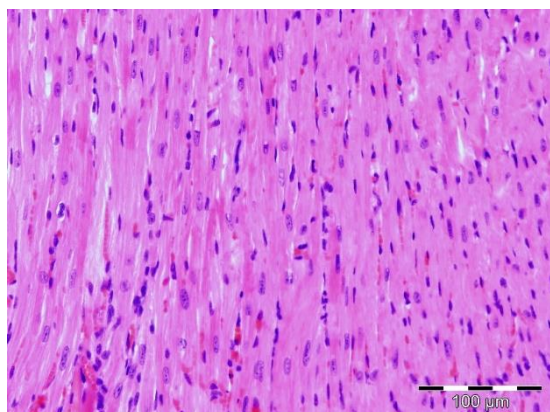


Figura 4. Cord. Șoarece. Lot S2
(oxazolona **11c**). Colorație HE, x200

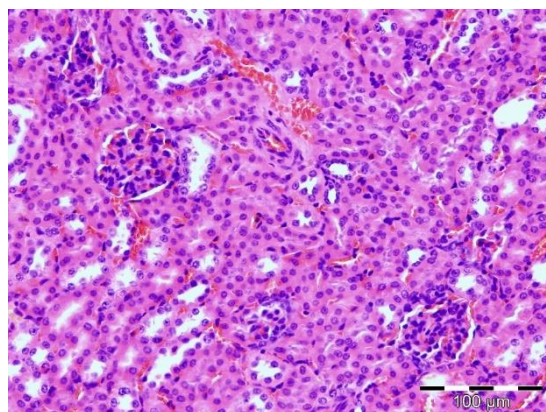


Figura 5. Rinichi. Șoarece. Lot S2
(oxazolona **11c**). Colorație HE, x200

Acțiunea analgezică a celor patru oxazol-5(4*H*)-one a fost cuantificată prin două teste farmacologice folosite pe scară largă pentru investigarea acțiunii analgezice a xenobioticelor: testul stimulului chimic și testul stimulului termic.

Rezultatele obținute în urma evaluării acțiunii analgezice a celor patru compuși, prin testul stimulului chimic, au evidențiat că oxazolona **11c**, care conține în moleculă grupa metoxi în poziția patru pe fragmentul benziliden, prezintă cel mai bun efect analgezic. Se poate deduce că un posibil mecanism de acțiune al oxazolonelor testate ar putea fi unul periferic, precum inhibiția ciclooxygenazei.

Conform rezultatelor testului stimulului termic se poate afirma că cei patru compuși testați nu prezintă acțiune analgezică de tip central.

Observațiile din cursul testului stimulului chimic, dar și studiul de andocare moleculară, evidențiază oxazolona **11c**, care prezintă în structură o grupă 4-metoxi pe fragmentul benzilidenic, ca având acțiune analgezică de tip periferic, aceasta fiind un candidat promițător pentru cercetări ulterioare în scopul definitivării profilului farmacologic al acesteia [42].

Evaluarea citotoxicității *in vitro* a unor noi compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor

Determinarea citotoxicității unora dintre noii compuși sintetizați reprezintă o etapă importantă în cadrul testării acțiunii biologice. Demersul a constat în observarea influenței acestora, la diferite concentrații, asupra dezvoltării microorganismelor din genurile *Daphnia sp.*, *Artemia sp.*, dar și asupra drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. S-a folosit ca solvent DMSO deoarece compușii testați prezintă o solubilitate bună în acesta și deoarece este biocompatibil cu microorganismele studiate.

Evaluarea citotoxicității prin testele de citotoxicitate *Daphnia magna* și *Artemia salina*

Rezultatele privind citotoxicitatea compușilor din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4H)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5H)-onelor asupra speciei *D. magna* au indicat că cei mai citotoxici sunt triazinonele **15a**, **16a**, **15c** și oxazolonele **6a**, **6c** și **12a**, cu valori ale CL₅₀ înregistrate după 48 ore cuprinse în intervalul 17,23-40,24 μg/mL.

Testul de citotoxicitate asupra *A. salina* a indicat că cea mai mare citotoxicitate o au oxazolonele **6b**, **6c** și **12b**, cu valori ale CL₅₀ înregistrate după 48 ore cuprinse în intervalul 21,84-51,6 μg/mL.

Compușii cu citotoxicitate mai mare pe cele două specii de nevertebrate studiate ar putea conduce la rezultate promițătoare în cadrul unor testări biologice ulterioare.

Evaluarea citotoxicității prin testul de creștere a *Saccharomyces cerevisiae*

În cadrul acestei determinări s-a evaluat citotoxicitatea unor compuși din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor și a 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor pe celula drojdiei *S. cerevisiae* la concentrații de 0,1 mM și 1 mM.

La concentrația 0,1 mM numai compusul **9a**, oxazolona substituită cu grupa 4-nitro pe nucleul benziliden, a inhibat într-o proporție mai mare creșterea culturii de drojdie (creșterea drojdiei a fost de 52%), comparativ cu celulele netratate (proba martor).

La concentrația de 1 mM, perechile de oxazolone precursor și triazinone **3c-15c**, **5a-17a**, **4b-16b**, dar și **9a-21a** au determinat o reducere a creșterii drojdiei, compușii **4b** și **9a** fiind cei mai citotoxici, comparativ cu proba martor, în prezența acestora *S. cerevisiae* având o creștere de 12,3%, respectiv 8,7%.

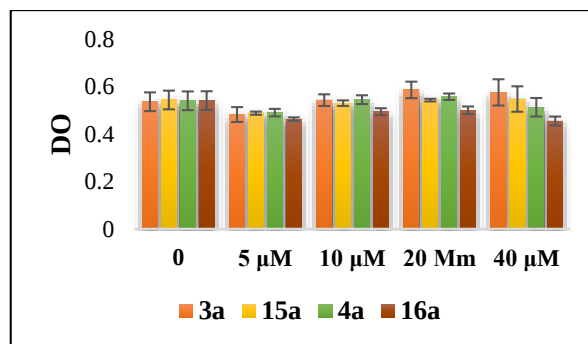
Analizând rezultatele se observă că cel mai toxic compus este oxazolona **9a**, atât la concentrația de 0,1 mM, cât și la 1 mM.

Evaluarea citotoxicității asupra unor linii celulare umane și de șoarece

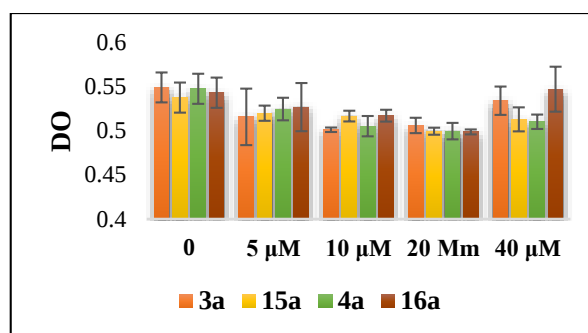
În cadrul studiului de față, evaluarea *in vitro* la nivel celular pentru unii compuși din cele două clase s-a realizat pe celule umane proliferative netumorale de tipul monocitelor din linia CRL9855 SC (ATCC® CRL9855™), pe o linie celulară umană de adenocarcinom de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™), pe o linie celulară umană de carcinom colorectal HCT 116 (ATCC® CCL-247™) și pe o linie celulară murină de melanom B16-F10 (ATCC® CRL-6475™).

Determinările experimentale au constatat în monitorizarea următorilor parametri celulari: viabilitatea și multiplicarea celulară evaluate prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazoliu (MTS) și moartea celulară, evaluată ca integritate a membranei plasmatică prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei (LDH).

Testele de citotoxicitate asupra celulelor normale proliferative din linia de monocite CRL9855 și asupra celulelor B16-F10, HT-29 și HCT 116 au relevat faptul că acești compuși testați nu sunt citotoxici în urma testelor de reducere a MTS și de eliberare a LDH, cu excepția triazinonei **16a**, care prezintă un atom de fluor pe fragmentul benziliden și care a manifestat un efect citostatic la concentrațiile 5 și 40 μM (Fig. 6) asupra liniei B16-F10 și un efect citotoxic la concentrația 2,5 μM asupra monocitelor CRL9855 (Fig. 7).

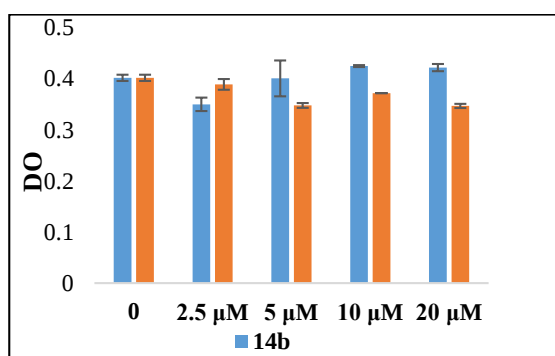


a)

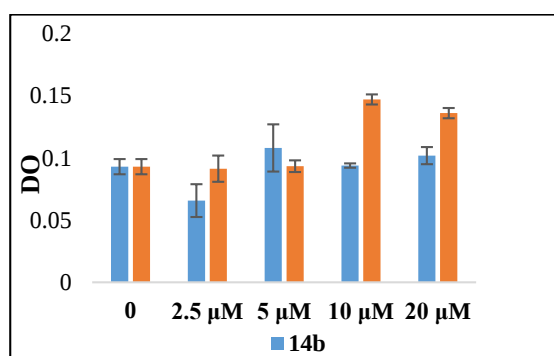


b)

Figura 6. Curbele doză-efect ale compușilor **3a**, **15a**, **4a**, **16a** asupra celulelor tumorale de melanom din linia B16-F10, privind efectul exercitat asupra reducerii MTS a) și eliberării LDH b). Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM pentru triplicat de probă



a)



b)

Figura 7. Curbele doză-efect ale compușilor oxazolonici **14b** și **14c** asupra celulelor netumorale proliferative din linia CRL9855 (celule monocitare), privind efectul exercitat asupra reducerii MTS a) și eliberării LDH b). Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM pentru triplicat de probă

Investigarea potențialului unor noi 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-one ca marcatori fluorescenți celulari

Datorită prezenței grupei dialchilamino despre care există mențiuni în literatură referitoare la efectul de intensificare a fluorescenței moleculare [43], s-au ales șase 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-one: **13a-c** (S1-S3) și **14a-c** (S4-S6) pentru care s-au investigat atât proprietățile optice, cât și capacitatea de a marca fluorescent diferite celule. O primă etapă în această evaluare a fost stabilirea proprietăților optice a celor șase noi oxazolone.

Excitația la o lungime de undă de 510 nm (maxim de absorbție în vizibil) duce la obținerea spectrelor de emisie de mai jos, care indică o fluorescență pentru toți compușii în domeniul 550-700 nm, mai puțin intensă în cazul oxazolonei **13b** (S2) și **13c** (S3) (Fig. 8).

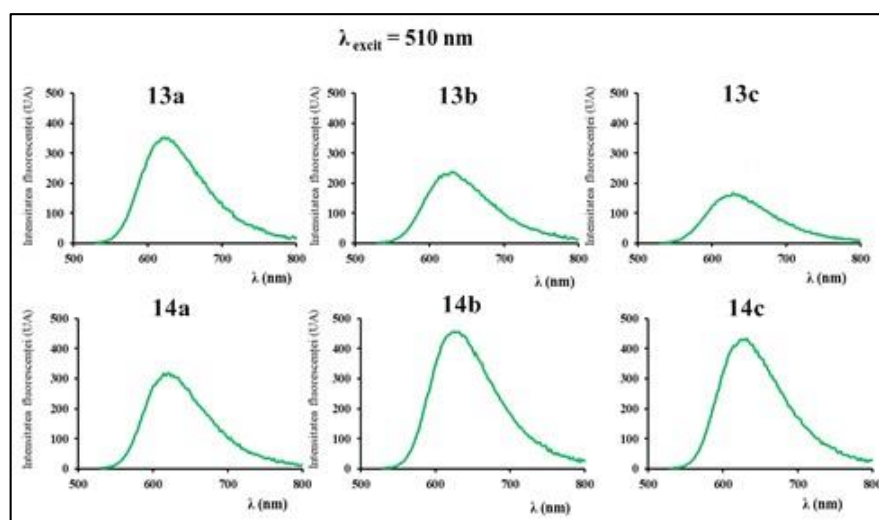


Figura 8. Spectrele de fluorescență în domeniul 500-800 nm pentru **13a-c** (S1-S3) și **14a-c** (S4-S6)

Studiul încorporării noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-one **13a-c** și **14a-c** în celulele de *S. cerevisiae*

Studiile de fluorescență și de localizare intracelulară au indicat că majoritatea oxazolonei studiate se regăsesc în citoplasma celulelor de *S. cerevisiae*, iar **13c**, **14a** (Fig. 9) și **14c** difuzează și în nucleu. Oxazolonele care prezintă atomul de clor pe fragmentul arilsulfonilfenil, **13b** și **14b**, dar și oxazolona **13a** nesubstituită pe același fragment nu prezintă o încorporare în procent mare în nucleul drojdiei, regăsindu-se preponderent în citosol. Se remarcă faptul că substituția pe fragmentul benziliden cu grupa dietilamino față

de grupa dimetilamino (compușii **14a** și **14c** față de **13a** și **13c**) duce la creșterea penetrabilității oxazolonei în nucleu.

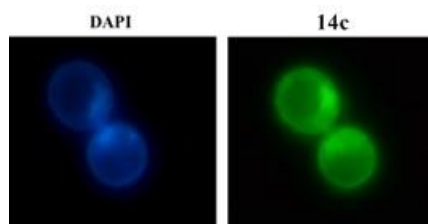


Figura 9. Imagini obținute prin microscopie de fluorescență a celulelor de *S. cerevisiae* co-marcate cu DAPI și oxazolona **14c** (S6)

Studiul încorporării și intensității fluorescenței noilor 4-(4-(dialchilamino)-benziliden)oxazol-5(4H)-one **13a-c și **14a-c** în celule normale și tumorale umane**

Studiul *in vitro* a fost realizat pe celule tumorale umane epiteliale colorectale din linia HCT 116 (carcinom colorectal, ATCC® CCL-247™) și de tip glioblastom din linia U-87 MG (ATCC® HTB-14™). În paralel, s-au realizat investigații pe celule umane proliferative netumorale de tipul monocitelor din linia CRL9855 SC (ATCC® CRL9855™).

Evaluarea încorporării noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-one fluorescente **13a-c și **14a-c** în celulele monocitare umane CRL9855**

Într-o primă etapă s-a investigat încorporarea noilor compuși **13a-c** și **14a-c**, la concentrația 20 μM, în monocite umane CRL9855, în raport cu un control care conține doar celule netratate cu oxazolone.

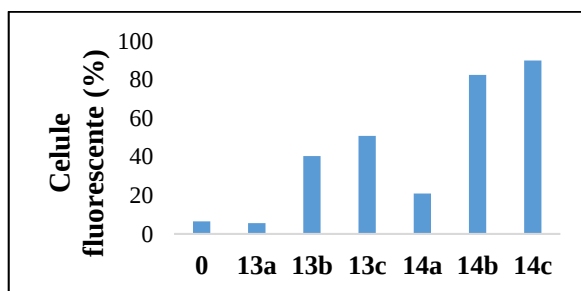


Figura 10. Încorporarea oxazolonei **13a-c** și **14a-c** în monocite umane din linia CRL9855, evaluată prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2 (portocaliu)). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule cu fluorescență pozitivă (fluorescență mai mare decât autofluorescența celulelor netratate cu oxazolone).

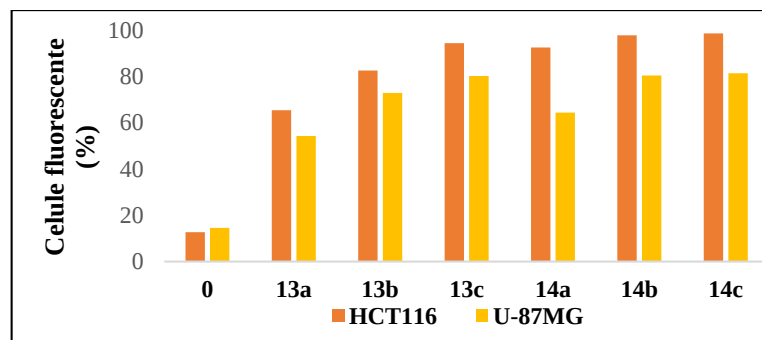
Din datele experimentale prezentate în figura 10 se observă că oxazolonele **14b** și **14c** sunt încorporate de majoritatea celulelor monocitare, 80-90% dintre celule prezentând fluorescență pozitivă (mai mare decât autofluorescența celulelor netratate cu oxazolone). Compușii **13b** și **13c** se încorporează mai puțin în monocite, doar 40-50% dintre acestea prezentând fluorescență pozitivă. Din grupul studiat, oxazolonele **13a** și **14a** au prezentat cea mai mică eficiență de încorporare, ceea ce indică faptul că derivații nesubstituiți pe nucleul arilsulfonilfenil nu penetrează eficient în monocitele umane proliferative.

Evaluarea încorporării noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-one fluorescente 13a-c și 14a-c în celule tumorale

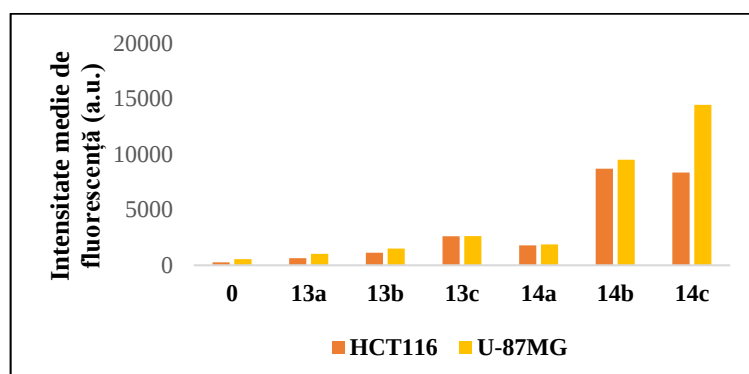
Oxazolonele **13a-c** și **14a-c** au fost testate comparativ pe linia tumorală umană de carcinom colorectal HCT 116 și pe linia tumorală de glioblastom U-87 MG. Rezultatele sub formă de procente de încorporare în celule tumorale și sub formă de intensitate medie de fluorescență în celule tumorale a compușilor testați, la concentrația 20 μ M, sunt prezentate în figura 11.

Conform datelor din figura 11, aproape toate celulele HCT 116 care au fost incubate cu oxazolonele **13c**, **14a**, **14b** și **14c** au prezentat fluorescență pozitivă (fluorescență mai mare decât autofluorescența celulelor netratate cu oxazolone). La incubarea celulelor tumorale cu compușii **13a** și **13b** s-au observat procente mai mici de celule fluorescente, cel mai mic procent înregistrându-se în cazul celulelor incubate cu derivatul **13a**, care nu este substituit pe fragmentul fenilsulfonilfenil.

În cazul celulelor de glioblastom uman din linia U-87 MG, procentul de celule cu fluorescență pozitivă este mai mic decât în cazul celulelor de carcinom colorectal HCT 116. Se remarcă faptul că un procent de aproximativ 80% din celulele U-87 MG incubate cu oxazolonele **13c**, **14b** și **14c** prezintă fluorescență pozitivă, iar procentul scade semnificativ atunci când celulele au fost incubate cu derivații **13a** și **14a**. Prin urmare se observă că derivații nesubstituiți pe nucleul fenilsulfonilfenil nu se încorporează eficient în celulele U-87 MG, fapt evident și în cazul încorporării în monocitele umane proliferative (Fig. 10).



a)

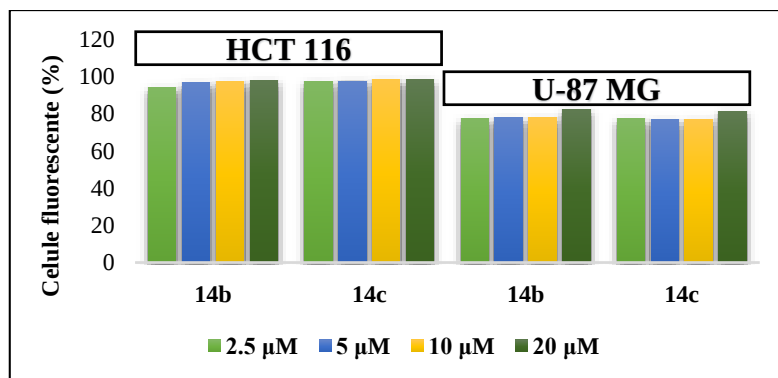


b)

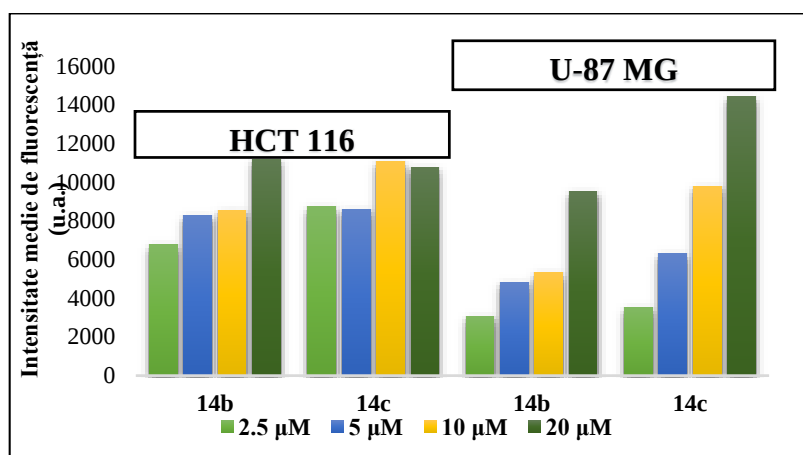
Figura 11. Fluorescența celulelor tumorale umane din linia HCT 116 (carcinom colorectal) și U-87 MG (glioblastom) incubate 24 de ore cu oxazolonele **13a-c** (S1-S3) și **14a-c** (S4-S6) la concentrația de 20 μ M. Evaluarea fluorescenței intracelulare s-a realizat prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2 (portocaliu)). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule fluorescente a) și ca intensitate medie de fluorescență b)

În continuare s-a efectuat un experiment privind dependența de concentrație în intervalul 2,5-20 μ M a fluorescenței intracelulare corespunzătoare compușilor **14b** și **14c** selectați în studiul anterior, experiment realizat pe celule tumorale de carcinom colorectal HCT 116 și de glioblastom U-87 MG. Procentul de celule cu fluorescență pozitivă este aproximativ același indiferent de concentrație, de peste 90% în cazul carcinomului colorectal și de aproximativ 77% pentru celulele de glioblastom (Fig. 12).

Se observă că procentul de celule tumorale în care cele două oxazolone investigate se încorporează în celule de cancer colorectal este semnificativ mai mare decât procentul de celule de glioblastom (Fig. 12.a). Din acest punct de vedere, rezultatele indică posibilitatea unei mai bune detecții a carcinomului colorectal utilizând oxazolonele **14b** și **14c**, comparativ cu glioblastomul.



a)



b)

Figura 12. Dependența de concentrație a fluorescenței celulelor tumorale umane din liniile HCT 116 și U-87 MG, incubate 24 de ore cu derivații oxazolonici **14b** și **14c** în intervalul de concentrații 2,5-20 μ M. Evaluarea fluorescenței intracelulare s-a realizat prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2 (portocaliu)). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule fluorescente a) și ca intensitate medie de fluorescență b)

Intensitatea medie de fluorescență (Fig. 12.b) este dependentă de concentrația derivaților **14b** și **14c** cu care au fost incubate celulele tumorale, cele mai mari valori înregistrându-se în general la concentrația cea mai mare testată (20 μ M). Saturarea încorporării oxazolonelor se produce doar în cazul compusului **14c**. Se remarcă de asemenea faptul că intensitatea medie de fluorescență indusă în ambele linii celulare tumorale de către compusul **14c** este mai mare decât cea corespunzătoare compusului **14b** la toate concentrațiile testate (Fig. 12.b). Deși procentul de celule de glioblastom care încorporează compusul **14c** este mai mic decât procentul de celule de carcinom colorectal (Fig. 12.a), totuși intensitatea medie de fluorescență este mai mare (Fig. 12.b), ceea ce sugerează că acest compus este adecvat totuși investigațiilor imagistice atât pentru carcinomul colorectal cât și pentru glioblastom.

Capitolul 7. Concluzii generale

Contextul actual din domeniul chimiei farmaceutice impune dezvoltarea unor noi agenți terapeutici cu efecte îmbunătățite, înțelegând prin aceasta obținerea unor compuși cu o toxicitate cât mai redusă și cu un profil farmacologic cât mai bun. De asemenea, identificarea unor marcatori celulari fluorescenți care să permită vizualizarea localizării maselor tumorale constituie un obiectiv prioritar, având în vedere ca bioimagingul joacă un rol important în patologia cancerului.

Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și testarea biologică a unor noi compuși heterociclici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor și 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor, obiective urmărite pe parcursul întregii lucrări, pot fi considerate ca îndeplinite.

În continuare sunt prezentate concluziile generale ale studiilor efectuate.

Sinteza și caracterizarea noilor compuși

S-au obținut 60 de compuși heterociclici noi, 35 pentaatomici din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor și 25 hexaatomici din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-5(6*H*)-onelor, care prezintă în structură fragmentul arilsulfonilfenil.

Metodele de sinteză a compușilor au condus, în general, la randamente bune și nu au implicat utilizarea unor instalații speciale sau a unui număr mare de precursori.

În scopul obținerii noilor compuși, într-o primă etapă s-au sintetizat trei aminoacizi N-acilați intermediari, acizii 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **1a-c**, printr-o sinteză multi-etapă.

Noile oxazolone au fost obținute prin metoda Erlenmeyer care a constat în ciclocondensarea intermediarilor **1a-c** cu diferite aldehide aromatice în mediu de anhidridă acetică și în prezență de acetat de sodiu. Derivații oxazolonici **11a-c** au fost obținuți printr-o a doua metodă, reacția aceluiași aminoacizi N-acilați intermediari **1a-c** cu aductul bisulfitic al 4-metoxibenzaldehidei, în prezență de oxitriclorură de fosfor, în acetonitril. Această a doua metodă de sinteză a fost abandonată în favoarea primei metode, deoarece randamentele de obținere a acestor derivați au fost mai mici și, în plus, a necesitat o etapă suplimentară, aceea de obținere a combinației bisulfitice a aldehidei.

Compușii din clasa 5-ariliden-1,2,4-triazin-6(5*H*)-onelor au fost obținuți prin reacția de condensare a unor 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-one **3-5**, **6b,c**, **7-9**, **10a,c**, **11** cu fenilhidrazina, în mediu de acid acetic și în prezență de acetat de sodiu. Metoda este avantajoasă deoarece utilizează ca materii prime noii compuși ariliden-oxazolonici sintetizați în cadrul acestei lucrări.

Caracterizarea fizico-chimică a oxazolonelor și a triazinonelor s-a realizat prin determinarea punctelor de topire și a solubilității acestora, structura chimică fiind confirmată prin analiză elementală (C, H, N, S) și analize spectrale (IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, SM).

Determinarea acțiunii antimicrobiene

Microorganismele utilizate în cadrul evaluării acțiunii antimicrobiene au fost reprezentate de tulpini microbiene de referință gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, și fungice, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Acțiunea antimicrobiană a unor noi oxazolone și triazinone s-a evaluat prin metoda difuzimetrică pe mediu agarizat, prin metoda microdiluțiilor în mediu lichid și prin metoda microtitrării biofilmului microbial. De asemenea, s-au realizat studii de andocare la nivelul subunității ribozomale 50S a *S. aureus* pentru 6 din oxazolonele testate.

Dintre compușii testați, oxazolonele au prezentat acțiune antimicrobiană mai bună pe unele dintre tulpinile luate în studiu față de triazinone, cele mai mici valori ale CMI, de 0,625 mg/mL, având oxazolonele **6a**, **6b**, **12a-c**, **9a** și **9b**. În cazul biofilmelor, tot oxazolonele **12a-c**, **6a**, **6b** și **9b** au prezentat acțiunea cea mai bună, cu valorile CMEB tot de 0,625 mg/mL, asemănătoare sau în unele cazuri chiar mai mici față de cele ale standardelor folosite.

Studiile de andocare moleculară efectuate pe derivații oxazolonici **6a-c** și **12a-c** au indicat că legarea de subunitatea ribozomală 50S a *S. aureus* reprezintă un mecanism probabil de acțiune.

Determinarea acțiunii antioxidante

Potențialul antioxidant a fost evaluat pentru toți cei 60 de compuși sintetizați, prin două metode: metoda DPPH și metoda ABTS. Rezultatele obținute au indicat un efect antioxidant slab, observându-se însă că în ambele metode un număr mai mare de triazinone a prezentat un procent de inhibiție mai bun față de oxazolonele precursorare.

Rezultatele obținute prin metoda ABTS au indicat o acțiune antioxidantă mai bună pentru șase compuși, patru dintre aceștia fiind din clasa triazinonelor și doi din clasa oxazolonelor, cu valori ale procentelor de inhibiție cuprinse între 30,53-39,58%. Dintre acești compuși, oxazolona **5a** a avut cea mai bună acțiune antioxidantă (39,58 %).

Determinarea acțiunii analgezice, a toxicității acute *in vivo* și examenul histopatologic

Evaluarea acțiunii analgezice s-a realizat pentru compușii din clasa oxazolonelor **3c**, **7c**, **9c** și **11c** prin testul stimulului chimic și prin testul stimulului termic.

Într-o primă etapă s-a determinat **toxicitatea acută *in vivo*** a acestor compuși. Conform ghidului OECD 423 pentru determinarea toxicității orale a substanțelor chimice după doză unică, cele patru oxazolone s-au încadrat în categoria 5 (DL_{50} 2000-5000 mg/kg, p.o).

Examenul histopatologic efectuat pe probe de organe (creier, cerebel, pulmon, cord, ficat, splină și rinichi) recoltate de la șoareci tratați cu compușii luați în studiu nu au indicat aspecte citohistopatologice ce pot fi atribuite unui proces infecțios, neoplazic sau citotoxic, nefiind constatate diferențe semnificative între loturile de șoareci cărora li s-au administrat oxazolonele testate și lotul martor.

În ceea ce privește **acțiunea analgezică**, rezultatele testului stimulului chimic au evidențiat că oxazolona **11c** (S2) care conține în structură o grupă 4-metoxi pe fragmentul benzilidenic, prezintă acțiune analgezică de tip periferic, mecanismul probabil de acțiune, conform studiului de andocare moleculară, fiind mai degrabă antagonismul canalelor de calciu TRPA1 sau TRPV1 decât cel de inhibare a COX, aceasta fiind un candidat promițător pentru cercetări ulterioare în scopul definitivării profilului farmacologic.

Determinarea citotoxicității

Determinarea citotoxicității unora dintre noii compuși sintetizați s-a realizat prin urmărirea influenței acestora, la diferite concentrații, asupra dezvoltării microorganismelor din genurile *Daphnia sp.*, *Artemia sp.*, dar și asupra drojdiei *S. cerevisiae*.

De asemenea s-a evaluat și citotoxicitatea unora dintre noii compuși asupra unor linii celulare normale și tumorale.

Rezultatele înregistrate în testul *D. magna* au indicat că cei mai citotoxici compuși sunt triazinonele **15a**, **16a**, **15c** și oxazolonele **6a**, **6c** și **12a**, cu valori ale CL_{50} determinate după 48 de ore cuprinse în intervalul 17,23-40,24 $\mu\text{g/mL}$. Rezultatele obținute privind citotoxicitatea compușilor testați asupra speciei *A. salina* au indicat că cea mai mare citotoxicitate o au oxazolonele **6b**, **6c** și **12b**, cu CL_{50} determinate după 48 de ore cuprinse în intervalul 21,84-51,6 $\mu\text{g/mL}$.

Testul de creștere a *S. cerevisiae* a evidențiat că cel mai toxic compus este oxazolona **9a**, atât la concentrația 0,1 mM (% creștere=52), cât și la 1 mM (% creștere=8,7).

Testele de citotoxicitate asupra celulelor normale din linia de monocite CRL9855 și asupra celulelor tumorale de melanom de șoarece B16-F10 și umane de adenocarcinom colorectal HT-29 și de carcinom colorectal HCT 116 au relevat faptul că acești compuși testați nu sunt citotoxici în urma testelor de reducere a MTS și de eliberare a LDH, cu excepția triazinonei **16a**, care a prezentat efect citostatic la concentrațiile 5 μM și 40 μM asupra liniei B16-F10 și efect citotoxic la concentrația 2,5 μM asupra monocitelor CRL9855.

Oxazolonele **14b** și **14c** nu afectează proliferarea celulelor tumorale investigate, dar tind să limiteze multiplicarea monocitelor CRL9855.

Determinarea potențialului de a marca fluorescent celule normale și tumorale

Studiul proprietăților optice a șase noi oxazolone care conțin în moleculă radicalii N,N-dimetilamino sau N,N-dietilamino a indicat că acestea prezintă fluorescență, fapt ce a condus spre investigarea potențialului lor de a marca celule umane sau non-umane, umane normale sau tumorale.

Studiile de fluorescență și de localizare intracelulară au indicat că majoritatea oxazolonei testate se regăsesc în citoplasma celulelor de *S. cerevisiae*, iar derivații **13c**, **14a** și **14c** difuzează și în nucleul drojdiei.

Se observă faptul că substituția pe fragmentul benziliden cu grupa dietilamino față de grupa dimetilamino (oxazolonele **14a** și **14c** față de oxazolonele **13a** și **13c**) duce la creșterea penetrabilității oxazolonei în nucleu.

Compușii oxazolonici **14b** și **14c** care conțin în moleculă radicalul N,N-dietilamino, la concentrațiile 10 μM și 20 μM, au capacitatea de a marca fluorescent unele tipuri de celule tumorale, cum ar fi cele de carcinom colorectal și de glioblastom, într-o măsură mult mai mare decât celulele netumorale monocitare.

Studiile preliminare de citotoxicitate au indicat că cele două oxazolone **14b** și **14c** nu prezintă citotoxicitate asupra liniilor tumorale testate. În concluzie, compușii **14b** și **14c** pot face deosebirea între țesuturile tumorale și cele normale, fiind astfel candidați promițători pentru imagistică în patologia oncologică.

Bibliografie selectivă

1. Ohlmeyer M, Zhou MM. Integration of small-molecule discovery in academic biomedical research. *Mt. Sinai J. Med.*, 2010, 77 (4), 350-357;
2. Rossa TA, Suveges NS, Sá MM, Cantillo D, Kappe CO. Continuous multistep synthesis of 2-(azidomethyl) oxazoles. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2018, 14, 506-514;
3. Kara IM, Polat S, Ince F, Gümüş C. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Oxaprozin and Naproxen Sodium After Removal of Impacted Lower Third Molars: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2010, 68 (5), 1018-1024;
4. NIH, National Center for Advancing Translational Sciences, Inxight: Drugs, Ditazole, <https://drugs.ncats.io/substance/H2BQI5Z8FT> (accesat pe 30.04.2020);
5. Stephenson ZA, Harvey RF, Pryde KR, Mistry S, Hardy RE, Serreli R, Chung I, Allen TEH, Stoneley M, MacFarlane M, Fischer PM, Hirst J, Kellam B, Willis AE. Identification of a novel toxicophore in anti-cancer chemotherapeutics that targets mitochondrial respiratory complex I. *eLife*, 2020, 9, e55845;
6. Rao NK, Rao TN, Parvatamma B, Prashanthi Y, Cheedarala RK. Novel Synthesis of 4-Benzylidene-2-((1-phenyl-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-yl)methyl) oxazol-5(4*H*)-one Derivatives Using 1,2,3-Tetrahydroisoquinoline and their Antimicrobial Activity. *Curr. Org. Synth.*, 2020, doi:10.2174/1570179417666200415151228;
7. Saour KY, Al-Bayati RIH, Shia JS, Synthesis of 4-benzylidene-2-(4-nitrophenyl)-4*H*-oxazol-5-one derivatives with suspected biological activity. *Chem. Mat. Res.*, 2015, 7 (7), 105-109;
8. Parveen M, Ali A, Ahmed S, Malla AM, Alam M, Pereira Silva PS, Ramos Silva M, Lee DU. Synthesis, bioassay, crystal structure and *ab initio* studies of Erlenmeyer azlactones. *Spectrochim Acta A*, 2013, 104, 538-545;
9. Mohamed LW, El-Badry OM, El-Ansary AK, Ismael A. Design & synthesis of novel oxazolone & triazinone derivatives and their biological evaluation as COX-2 inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 2017, 72, 308-314;
10. Mariappan G, Sarkar D, Karki R, Pandey L, Kumar D. Synthesis and biological evaluation of oxazolone derivatives. *J. Glob. Pharma. Technol.*, 2010, 2 (10), 28-33;
11. Jat LR, Mishra R, Pathak D. Synthesis and anticancer activity of 4-benzylidene-2-phenyloxazol-5(4*H*)-one derivatives. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2012, 4 (1), 378-380;

12. Mariappan G, Saha BP, Datta S, Kumar D, Haldar PK. Design, synthesis and antidiabetic evaluation of oxazolone derivatives. *J. Chem. Sci.*, 2011, 123 (3), 335-341;
13. Abdel-Galil E, Moawad EB, El-Mekabaty A, Said GE. Synthesis and Biological Evaluation of New Multifunctional Oxazolone Scaffolds Incorporating Phenyl Benzoate Moiety. *J. Het. Chem.*, 2018, 55 (5), 1092-1100;
14. Krawczyk P, Bratkowska M, Wybranowski T. Experimental and theoretical insight into spectroscopic properties and bioactivity of 4-(4-formylbenzylidene)-2-phenyloxazol-5(4H)-one dye for future applications in biochemistry. *J. Mol. Liq.*, 2020, 314, 113632, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113632>;
15. Sharada LN, Aparna Y, Saba M, Sunita SNT, Viveka L. A Review on Reactions and Applications of Oxazolones. *IJSRP*, 2015, 5 (6), 1-8;
16. Mady MF, Saleh TS, El-Kateb AA, Abd El-Rahman NM, Abd El-Moez SI. Microwave-assisted synthesis of novel pyrazole and pyrazolo[3,4-*d*]pyridazine derivatives incorporating diaryl sulfone moiety as potential antimicrobial agents. *Res. Chem. Intermed.*, 2016, 42, 753-769;
17. Ragno R, Coluccia A, La Regina G, Silvestri R. Indolyl aryl sulphones As HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: docking and 3D Qsar studies. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2007, 2 (1), 87-114;
18. Mady MF, Awad GEA, Jorgensen KB. Ultrasound-assisted synthesis of novel 1,2,3-triazoles coupled diaryl sulfone moieties by the CuAAC reaction, and biological evaluation of them as antioxidant and antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 84, 433-443;
19. Shaaban MR, Saleh TS, Mayhoub AS, Mansour A, Farag AM. Synthesis and analgesic/anti-inflammatory evaluation of fused heterocyclic ring systems incorporating phenylsulfonyl moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 6344-6352;
20. Al-Said MS, Ghorab MM, Nissan YM. Dapsone in heterocyclic chemistry, part VIII: synthesis, molecular docking and anticancer activity of some novel sulfonylbiscompounds carrying biologically active 1,3-dihydropyridine, chromene and chromenopyridine moieties. *Chem. Cent. J.*, 2012, 6 (64), 2-14;
21. Wozel G, Blasum C. Dapsone in dermatology and beyond. *Arch. Dermatol. Res.*, 2014, 306, 103-124;
22. Barbuceanu SF, Bancescu G, Saramet G, Barbuceanu F, Draghici C, Radulescu FS, Ionescu A, Negres S. Synthesis and biological evaluation of some new N1-[4-(4-chlorophenylsulfonyl)benzoyl]-N4-(aryl)-thiosemicarbazides and products of their cyclization. *Heteroat. Chem.*, 2013, 24 (4), 309-321;

23. Barbuceanu SF, Ilies DC, Saramet G, Uivarosi V, Draghici C, Radulescu V. Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of New Compounds from Hydrazinecarbothioamide and 1,2,4-Triazole Class Containing Diarylsulfone and 2,4-Difluorophenyl Moieties. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15 (6), 10908-10925;
24. Karam S, Gutgarts V, Glezerman I. 19 - Chemotherapy in chronic kidney disease and dialysis, în Finkel KW, Perazella MA, Cohen EP. *Onco-Nephrology*, Elsevier, 2020, p. 183-196;
25. Hur YJ. Comparison of lamotrigine and oxcarbazepine monotherapy for pediatric focal epilepsy: An observational study. *Seizure Eur. J. Epilep.*, 2018, 60, 123-126;
26. Kotani A, Hirai J, Hamada Y, Fujita J, Hakamata H. Determination of ceftriaxone concentration in human cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B*, 2019, 1124, 161-164;
27. Abu-Melha S. Synthesis, antimicrobial evaluation and spectroscopic characterization of novel imidazolone, triazole and triazinone derivatives. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2012, 96, 898-905;
28. Zaki I, Abdelhameid MK, El-Deen IM, Abdel Wahad AHA, Ashmawy AM, Mohamed KO. Design, synthesis and screening of 1,2,4-triazinone derivatives as potential antitumor agents with apoptosis inducing activity on MCF-7 breast cancer cell line. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, 156, 563-579;
29. Rao YS, Filler R. *Oxazolones*. În *Oxazoles*, Wiley, New York, 1986, p. 362-363;
30. Mavridis E, Bermperoglou E, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D. 5-(4*H*)-Oxazolones and Their Benzamides as Potential Bioactive Small Molecules. *Molecules*, 2020, 25 (14), 3173
31. El-Hady HA, El-Sakka SS. Syntheses and antitumor activity of some 1,2,4-triazine derivatives. *IJIRSET*, 2014, 3 (4), 10854-10860;
32. Ertekin K, Alp S, Karapire C, Yenigül B, Henden E, Içli S. Fluorescence emission studies of an azlactone derivative embedded in polymer films. An optical sensor for pH measurements. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2000, 137, 155-161;
33. De Carvalho SC, Matsumura CY, Neto HS, Marques MJ. Identification of plasma interleukins as biomarkers for deflazacort and omega-3 based Duchenne muscular dystrophy therapy. *Cytokine*, 2018, 102, 55-61;
34. Scheinfeld N. Telithromycin: a brief review of a new ketolide antibiotic. *J. Drugs Dermatol.*, 2004, 3 (4), 409-413;
35. Pilyugin VS, Kuznetsova SL, Sapozhnikov YE, Chikisheva GE, Kiseleva GV, Vorob'eva TP, Klimakova EV, Sapozhnikova NA, Davletov RD, Galeeva ZB. Synthesis

- and fungicidal activity of bis(2-arylcarbonylamino-1*H*-benzimidazol-5-yl)sulfones. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2008, 78 (3), 446-450;
36. Schiketanz I, Draghici C, Saramet I, Balaban AT. Aminoketone, oxazole and thiazole synthesis. Part 15.¹ 2-[4-(4-Halobenzenesulphonyl)-phenyl]-5-aryloxazoles. *Arkivoc*, 2002, ii, 64-72;
37. Schiketanz I, Drăghici C, Șaramet I, Balaban AT. Aminoketone, oxazole and thiazole synthesis. Part. 16. ¹ Novel 5-aryl-2-(para-benzenesulfonylphenyl)-oxazoles. *Rev. Roum. Chim.*, 2002, 47 (3-4), 235-238;
38. **Rosca EV**, Apostol TV, Draghici C, Olaru OT, Socea LI, Iscrulescu L, Saramet G, Barbuceanu F, Pahontu EM, Baraitareanu S, Barbuceanu SF. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation of New Compounds from Oxazol-5(4*H*)-ones and 1,2,4-Triazin-6(5*H*)-ones. *Rev. Chim.*, 2019, 70 (11), 3769-3774;
39. **Roșca EV**, Apostol TV, Chifiriuc MC, Grădișteanu Pîrcălabioru G, Drăghici C, Socea LI, Olaru OT, Nițulescu GM, Pahonțu EM, Hrubaru M, Bărbuceanu ȘF. *In silico* and experimental studies for the development of novel oxazol-5(4*H*)-ones with pharmacological potential. *Farmacia*, 2020, 68 (3), 453-462;
40. Khosropour AR, Khodaei MM, Hoseini Jomor SJ. A New, Efficient and Chemoselective One-Pot Protocol for Synthesis of 4-Arylidene-2-phenyl-5(4*H*)-oxazolones from Aryl Aldehyde Bisulfite Adducts Promoted by POCl₃. *J. Het. Chem.*, 2008, 45, 683-686;
41. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Acute oral toxicity-acute toxic class method. Test No. 423, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Publishing, 2002, Section 4, 1-14;
42. Bărbuceanu F, **Roșca EV**, Apostol TV, Șeremet OC, Drăghici C, Mihai DP, Negreș S, Nițulescu GM, Bărbuceanu ȘF. New 2-(4-(4-bromophenylsulfonyl)phenyl)-4-arylidene-oxazol-5(4*H*)-ones: analgesic activity and histopathological assessment. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 2020, 61 (2), 493-502;
43. Icli S, Icil H, Alp S, Koc H, Mckillop A. NMR, Absorption and Fluorescence Parameters of Azlactones. *Spectrosc. Lett.*, 1994, 27 (9), 1115-1128;

Listă cu lucrările științifice publicate și participări la proiecte

Lucrări publicate în reviste indexate ISI/BDI

1. **Rosca EV**, Apostol TV, Draghici C, Olaru OT, Socea LI, Iscrulescu L, Saramet G, Barbuceanu F, Pahontu EM, Baraitareanu S, Barbuceanu SF. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation of New Compounds from Oxazol-5(4*H*)-ones and 1,2,4-Triazin-6(5*H*)-ones. *Rev. Chim. (Bucharest)*, 2019, 70 (11), 3769-3774, (ISI, FI=1,755/2019) <https://doi.org/10.37358/RC.70.19>

2. **Roșca EV**, Apostol TV, Chifiriuc MC, Grădișteanu Pîrcălabioru G, Drăghici C, Socea LI, Olaru OT, Nițulescu GM, Pahonțu EM, Hrubaru M, Bărbuceanu ȘF. *In silico* and experimental studies for the development of novel oxazol-5(4*H*)-ones with pharmacological potential. *Farmacia*, 2020, 68 (3), 453-462, (ISI, FI=1,607/2019), <http://farmaciajournal.com/issues/farmacia-journal-3-2020/>

3. Bărbuceanu F, **Roșca EV**, Apostol TV, Șeremet OC, Drăghici C, Mihai DP, Negreș S, Nițulescu GM, Bărbuceanu ȘF. New 2-(4-(4-bromophenylsulfonyl)phenyl)-4-arylidene-oxazol-5(4*H*)-ones: analgesic activity and histopathological assesement. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 2020, 61 (2), 493-502, (ISI, FI=1,411/2019), <https://rjme.ro/archive/61/2/19/>

Cerere de brevet

„Derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4*H*)-onă fluorescenți, necitotici cu aplicații biomedicale care conțin un radical arilsulfonilfenil în poziția 2”

Cerere nr. A2020/00490 (03.08.2020)

Inventatori: **Roșca EV**, Bărbuceanu ȘF, Apostol TV, Manda G, Drăghici C, Fărcășanu IC, Neagoe IV, Surcel M, Ruță LL, Nițulescu GM, Bărbuceanu F, Iscrulescu L, Dinu Pârvu CE.

Lucrări publicate sub formă de postere sau prezentări orale

1. **Roșca EV**, Bărbuceanu ȘF, Apostol TV, Socea LI, Șaramet G, Iscrulescu L, Drăghici C. Synthesis and Characterization of New Heterocyclic Compounds from 4-arylidene-oxazole-5(4*H*)-ones with Potential Biological Activity, e-Poster (ID: 120), Congresul Național de Farmacie, ediția a XVII-a, 26-29 septembrie, 2018, abstract publicat în culegerea de rezumate pe CD, p. 39, ISSN 2537-2823, ISSN-L 2537-2823

2. Rosca EV, Farcasanu IC, Ruta LL, Apostol TV, Iscrulescu L, Draghici C, Barbuceanu F, Baraitareanu S, Barbuceanu SF. Synthesis, Characterization and Toxicity Assessment Against *Saccharomyces Cerevisiae* of Some New Compounds from Oxazol-5(4*H*)-ones and 1,2,4-Triazin-6(5*H*)-ones Classes, Poster S1-328, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Constanța-Mamaia, România, 4-7 Septembrie, 2019

3. Roșca EV, Manda G, Neagoe IV, Apostol TV, Iscrulescu L, Socea LI, Pahonțu EM, Drăghici C, Bărbuceanu ȘF. Synthesis, Characterization and Antineoplastic Assessment of New Oxazole-5(4*H*)-Ones and Their Corresponding 1,2,4-Triazin-6(5*H*)-Ones, Prezentare orală (ID: 152), Congresul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” - București, Editia a VII-a, 10-12 Octombrie 2019, București, abstract publicat în Maedica a Journal of Clinical Medicine, 2019, Vol. 14 (17), Supplement, p. 4-5; ISSN: 2501-6903, ISSN-L: 2501-6903

Participări la proiecte

Am fost asistent de cercetare în cadrul proiectului „Dezvoltarea de radiofarmaceutice și tehnici nucleare în oncologie pentru imagistică și tratament personalizat la nivel molecular”, acronim: ONCORAD, Cod: 64PCDI/2018, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării prin Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI), 2018-2020, în care am fost responsabilă de studiul pe animalele de laborator.